柑桔始叶螨与柑桔全爪螨染色体制备方法与核型探讨

邹方东，岳碧松，徐 柳*，张义正，曾宗永**
（四川大学生命科学学院，成都 610064）

摘要：采用一种新的染色体制备方法，成功地制备和观察了柑桔始叶螨和柑桔全爪螨的中期染色体。柑桔始叶螨的核型 n＝4、2n＝8，柑桔全爪螨的核型 n＝3、2n＝6 或 n＝4、2n＝8。C-显带与扫描电镜结果显示，柑桔始叶螨与柑桔全爪螨为全着丝粒染色体，并存在混倍性现象。

关键词：叶螨；染色体制备；核型；全着丝粒染色体；混倍性
中图分类号：Q963 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）05-0662-04

Use of a new method to study karyotypes of *Eotetranychus kankitus* and *Panonychus citri*

ZOU Fang-Dong，YUE Bi-Song，XU Liu*，ZHANG Yi-Zheng，ZENG Zong-Yong**（College of Life Science，Sichuan University，Chengdu 610064，China）

Abstract：A new method had been developed to prepare the chromosomes of *Eotetranychus kankitus* Ehara and *Panonychus citri*（McGregor）. It was found that the karyotype of *Eotetranychus kankitus* Ehara is n＝4，2n＝8，and that of *Panonychus citri* is n＝3，2n＝6 or n＝4，2n＝8. The results of C-banding and scanning electromicroscope photographs indicated that chromosomes of these species were holokinetic. Mixoploidy was also discovered in the karyotypes of these mites.

Key words：leaf mite；chromosome preparation；karyotype；holokinetic chromosome；mixoploidy

叶螨总科的成员都是危害各种经济树木的害虫。柑桔始叶螨 *Eotetranychus kankitus* Ehara 在分类学上属于叶螨科，俗称"黄蜘蛛"，主要靠吸食柑桔叶汁生存，对柑桔树有很大的危害作用。柑桔始叶螨雌虫可行孤雌生殖，所产卵为单倍体，发育为雄虫；二倍体卵是受精后产下的，既可发育为雌虫，也可发育为雄虫（王慧芙，1981）。柑桔全爪螨 *Panonychus citri*（McGregor）同属叶螨总科，叶螨科，俗称"红蜘蛛"，每年春、秋季是危害高峰期，类同柑桔始叶螨可行孤雌生殖。

以往对叶螨总科染色体的研究表明，其核型多为 2n＝4（Griffiths and Bowman，1984）。传统的螨类染色体的制备方法通常有两种：一种是取卵，用压片法制备染色体（Griffiths and Bowman，1984）；另一种是取成虫的生殖腺，用空气干燥法制片（王灵岚和王敦清，1987）。但压片法制备的染色体背景很脏，而且叶螨个体微小，取材不易，因此上述两种方法多有不便且制片质量不高。我们采用一种新的叶螨染色体的制备方法，成功地得到了柑桔始叶螨和柑桔全爪螨的核型，并确定为全着丝粒染色体，同时发现存在染色体混倍性现象。

1 材料与方法

1.1 供试螨

柑桔始叶螨和柑桔全爪螨均采自四川大学校园内的柑桔树。柑桔始叶螨与柑桔全爪螨的饲养采用离体叶法（Zhou *et al*.，1999）。用狼毫毛笔将成螨转移到柑桔叶背面，30℃恒温培养，让雌成螨产卵 4 h，收集经过 12 h 发育后的柑桔始叶螨卵和经过

第一作者简介：邹方东，男，1970 年 11 月生，四川渠县人，硕士，副教授，遗传学研究方向，E-mail：fundzou@163.com
＊现在工作单位：西南交通大学生物工程系，成都 610031
＊＊ 通讯联系人 Author for correspondence
收稿日期 Received：2000-07-04；接受日期 Accepted：2002-01-15

20 h 左右发育后的柑桔全爪螨卵，用秋水仙素（终浓度 1 μg/mL）处理 2 h，用于染色体制备。同时取幼虫按离体叶法进行单只隔离培养，收集卵用于染色体制备。

1.2 染色体的制备

取 10 枚左右卵置于洁净的载玻片上，在解剖镜下用解剖针将卵挑破，并在载玻片上轻轻一拖，稍后滴加 2～3 滴蒸馏水于载玻片上，低渗 9 min（柑桔全爪螨的卵细胞需低渗 12 min 左右），再用滤纸从边沿吸去低渗液，然后用固定液（甲醇:冰醋酸 = 3:1）固定 30 min 左右，载玻片风干后，用 10% Giemsa 染液（pH 6.8 的磷酸缓冲液配制）染色 30 min 左右，自来水细流冲洗，晾干，显微镜观察，选取分散较好的中期分裂相进行显微摄影。

1.3 C-带显带

取制片 5～7 天的标本，采用 BSG 法显带（叶韵斌和王敦清，1992）。

1.4 扫描电镜样本制备

选出分裂相较多的玻片进行扫描电镜观察，如果是预先用油镜观察过的标本，则需事先用二甲苯脱油后，再按常规制备扫描电镜样本。

2 结果

2.1 柑桔始叶螨与柑桔全爪螨核型

取柑桔始叶螨经隔离培养产卵的制片标本，共计观察 50 多个有丝分裂中期相，发现其染色体数目多为 4 条（图版Ⅰ：A）。雌雄混合培养产卵的制片标本，共计观察 100 多个中期分裂相，发现有的分裂相为 8 条染色体，有的为 4 条。8 条染色体可以两两配对（图版Ⅰ：B）。柑桔始叶螨隔离培养所产卵为单倍体，且 4 条染色体相对长度各不相同（如表 1）。染色体相对长度等于该条染色体长度除以单倍染色体总长度，再乘以 100%，用百分率表示。由此可确定柑桔始叶螨核型 n = 4、2n = 8。

同时，实验还发现柑桔始叶螨存在三倍体，即中期分裂相染色体数为 12 条（图版Ⅰ：C）。

共统计柑桔全爪螨 70 多个有丝分裂中期相，发现其染色体数目变化较大。隔离培养的柑桔全爪螨染色体多为 3 条或 4 条，混合培养的同一胚胎细胞群有 3、4、5、6、8 条染色体的分裂相出现。统计发现染色体数目 3 条占 8.6%，4 条占 21%，5 条占 16%，6 条占 38%，8 条占 16.6%。n = 3、2n = 6 时染色体相对长度与 n = 4、2n = 8 时染色体相对长度见表 1，2n = 6 或 2n = 8 时，染色体均可两两配对，相对长度分别与 n = 3 或 n = 4 时一样。因此，柑桔全爪螨核型是 n = 3、2n = 6 或 n = 4、2n = 8（图版Ⅰ：E、F、G、H）。

表 1 柑桔始叶螨与柑桔全爪螨染色体的相对长度

Table 1 Relative length of chromosomes of *Eotetranychus kankitus* and *Panonychus citri*

螨种类 Mite species	染色体编号 Chromosome No.	染色体相对长度（$X \pm SE$） Chromosome relative length
柑桔始叶螨 *E. kankitus*		
n = 4，2n = 8	1	31.1 ± 1.2
	2	26.0 ± 0.8
	3	23.0 ± 1.0
	4	20.0 ± 1.0
柑桔全爪螨 *P. citri*		
n = 3，2n = 6	1	40.1 ± 0.9
	2	31.5 ± 1.0
	3	28.5 ± 0.5
n = 4，2n = 8	1	29.4 ± 1.2
	2	26.1 ± 0.8
	3	25.2 ± 0.9
	4	21.1 ± 0.5

2.2 染色体 C-带及扫描电镜结果

采用 BSG 法，进行了多次实验，发现经处理后的柑桔始叶螨与柑桔全爪螨染色体染色均匀，在光镜下未见到 C-带带纹。从扫描电镜照片可见，染色体表面较平整，观察不到明显的着丝粒缢痕（图版Ⅰ：D）。结合光镜结果，我们可以确定柑桔始叶螨与柑桔全爪螨的染色体为全着丝粒类型。

3 讨论

3.1 染色体制备方法的探讨

螨类染色体制备方法通常有两种：一种是取卵，用压片法制备染色体（Griffiths and Bowman，1984）；另一种是取成虫的生殖腺，用空气干燥法制片（王灵岚和王敦清，1987）。压片法虽简单，但染色体分散不好，背景脏，很难在显微镜下观察。空气干燥法原用于哺乳动物染色体的研究，它要求制备一定密度的细胞悬浮液，因而众多的细胞

来源是该方法的首要条件。但蜱螨类生物细胞来源并不丰富，因而染色体的研究受到很大限制。王灵岚和王敦清（1988）采用了一种改良的空气干燥法，以成螨为材料，成功用于蜱螨染色体的研究。但无论是常规法还是改良法，所用材料都是虫体或虫体的某一组织。柑桔始叶螨和全爪螨个体都非常微小，对特定组织的解剖取材十分困难，所以我们采用卵作为实验材料，用来制备染色体。实验证明用卵作材料，方法简便，染色体分散好，背景干净，成功率较高（见图版Ⅰ）。但仍需注意掌握好卵发育的时间，如果发育时间过长，一方面会导致进入分裂相的细胞数量减少，另一方面会让染色体变得更加短小，甚至呈点状，不便于观察；如果卵发育时间过短，也会导致细胞数量稀少，难以找到染色体。

染色体扫描电镜标本制备难度较大，要在电镜下观察螨类的微小染色体更是不容易。为了提高电镜观察的成功率，在电镜观察前最好先确定染色体在载玻片上的位置。由于柑桔始叶螨与柑桔全爪螨染色体只有在油镜下才能观察清楚，所以先用油镜观察确定位置，然后脱油、干燥、镀金，用于扫描电镜观察。这对于微小染色体的制备十分可行。

3.2 关于柑桔始叶螨与柑桔全爪螨的核型

柑桔始叶螨与柑桔全爪螨的核型比较复杂。实验中发现，柑桔始叶螨存在混倍性现象（mixoploidy或polysomaty），即二倍体生物中正常组织的细胞群间二倍体与多倍体或单倍体彼此相邻存在的现象（彩万志，1994）。混倍性可能是由于有丝分裂不规则，细胞融合、核融合或无丝分裂所产生。而柑桔全爪螨同一胚胎细胞群中有3、4、5、6、8条染色体的分裂相出现，因这种现象有一定重复性，可基本排除是因为制片导致染色体丢失的可能，这种现象在高等动物中是不曾有的。资料显示柑桔全爪螨的染色体数目为 $n=3$、$2n=6$，但在本实验中经统计意外发现柑桔全爪螨的核型为 $n=3$、$2n=6$ 或 $n=4$、$2n=8$。这种在同一胚胎细胞群的不同细胞之间存在的不同核型的嵌合现象，其生物学意义如何，以及是否属于染色体多态现象（chromosome polymorphism），即染色体数目、形态及结构存在差异，还有待进一步研究。染色体多态现象在昆虫中曾有报道，如Imai等（Imai *et al.*，1988）发现一种切叶蚁 *Myrmecina pilosula* 染色体就属于多态，其 $2n=2$、3、4。

3.3 着丝粒类型

目前，蜱螨细胞遗传学资料表明，在各种蜱螨的染色体中明显存在单着丝粒（monokinetic chromosome）和全着丝粒（holokinetic chromosome）两类染色体。前者存在于后气门亚目（Metastigmata）的蜱和中气门亚目（Mesostigmata）的革螨中。后者存在于前气门亚目（Prostigmata）和无气门亚目（Astigmata）的螨类中。柑桔始叶螨与柑桔全爪螨同属于前气门亚目。以往对染色体的研究结果表明，在细胞分裂中期，微管束在二斑叶螨 *Tetranychus utricae* Koch染色体上分布均匀，没有固定的着丝粒区域（Griffiths and Bowman，1984）。叶韵斌和王敦清（1992）发现恙螨染色体也没有明显的缢痕。我们的实验结果显示，柑桔始叶螨与柑桔全爪螨染色体在光镜与扫描电镜下都未见明显的C-带和缢痕，因此，推断其染色体为全着丝粒类型。

参 考 文 献 （References）

Cai W Z，1994. Some basic problems in the cytotaxonomy of insects with special reference to methods for chromosome phylogenetic reconstruction. *Entomotaxonomia*，16（1）：3－14.［彩万志，1994. 昆虫细胞分类学的基本问题及染色体系统发育的重建方法. 昆虫分类学报，16（1）：3－14］

Griffiths D A，Bowman C E，1984. Acarology Ⅵ，Vol. 1. Great Britain: Ellis Horwood Limited. 449－453.

Imai H T，Taylor R W，Crozier R H，Crossland M W L，Browning G P，1988. Chromosomal poymorphism in the ant（*Myrmecina pilosula*）n = 1. *Ann. Report Nat. Inst. Genet.*（*Jap.*），38：82－84.

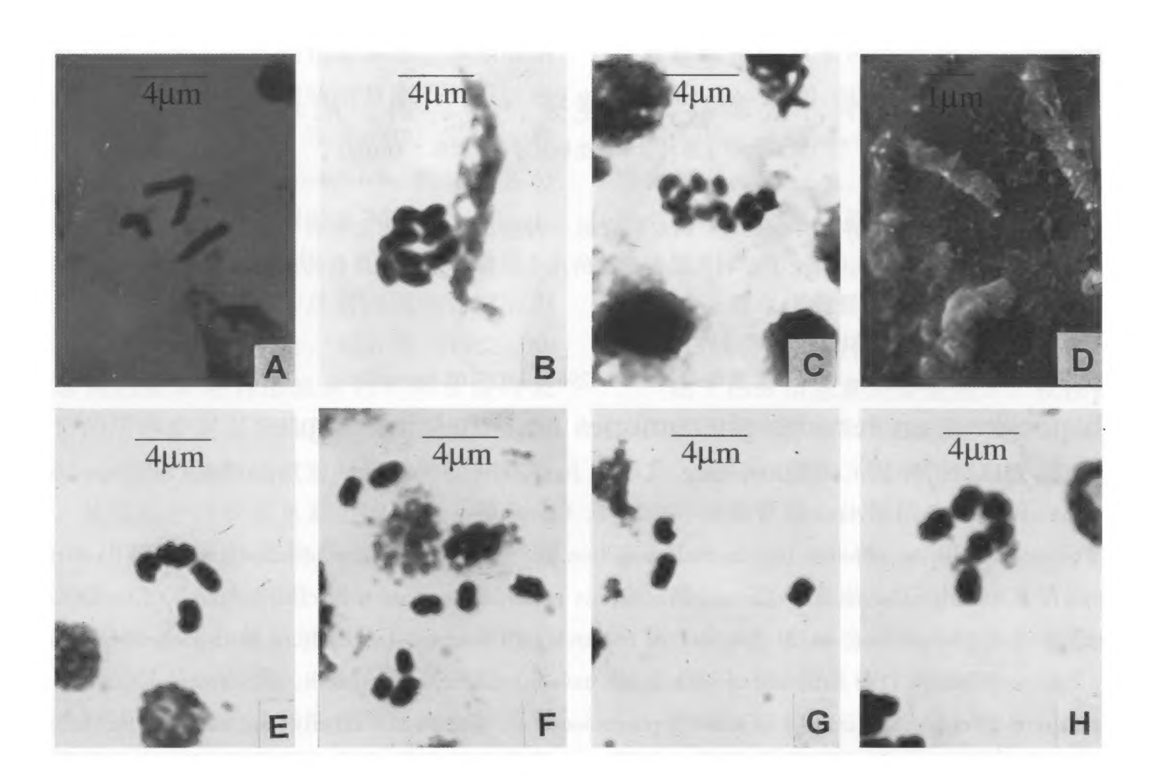
Wang H F，1981. Economic Insect Fauna of China. Fasc. 23. Acariformes: Tetranychoidea Beijing: China Science Press. 9－10.［王慧芙，1981. 中国经济昆虫志，第23册，螨目叶螨总科. 北京：科学出版社. 9－10］

Wang L L，Wang D Q，1987. Discuss the method of preparing chromosome of chigger mites. *Hereditas*，9（4）：32－34.［王灵岚，王敦清，1987. 恙螨染色体制备方法的探讨. 遗传，9（4）：32－34］

Wang L L，Wang D Q，1988. Studies on the five karyotypes of five chigger mites（Acari: Trombiculidae & Leeuwenhoekiidae）. *Acta Entomol. Sin.*，31（2）：171－175.［王灵岚，王敦清，1988. 五种恙螨染色体核型的研究. 昆虫学报，31（2）：171－175］

Ye Y B，Wang D Q，1992. Preliminary studies on the chromosome band displaying of chigger mites. *Acta Entomol. Sin.*，35（2）：165－169.［叶韵斌，王敦清，1992. 恙螨染色体分带的初步研究. 昆虫学报，35（2）：165－169.

Zhou L，Yue B S，Zou F D，1999. Life table studies of *Eotetranychus kankitus*（Acari: Tetranychidae）at different temperatures. *Sys. Appl. Acarol.*，4：69－73.



A，B，C. 柑桔始叶螨核型 A, B and C showing the haploid, diploid and terploid karyotypes of *Eotetranychus kankitus*, respectively: A. n = 4; B. 2n = 8; C. 3n = 12;

D. 柑桔始叶螨单倍染色体扫描电镜照片 The scanning electron microscope photograph of *Eotetranychus kankitus* haploid chromosomes;

E，F，G，H. 柑桔全爪螨核型 E, F, G and H showing the different karyotypes of *Panonychus citri*, respectively: E. n = 4; F. 2n = 8; G. n = 3; H. 2n = 6